

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-097399

(43)Date of publication of application : 11.04.1995

(51)Int.Cl.

C07K 14/47
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/53
// C07K 99:00

(21)Application number : 05-265681

(71)Applicant : FUJIREBIO INC

(22)Date of filing : 29.09.1993

(72)Inventor : FUJITA KEIKO
MARUYAMA NAOKI

(54) NEW POLYPEPTIDE AND REAGENT FOR MEASURING HUMAN SENESCENCE MARKER PROTEIN SMP 30

(57)Abstract:

PURPOSE: To isolate and establish human senescence-related protein H-SMP 30 and further establish its binding protein and to provide an immunological measurement method for which it is utilized, a DNA coding H-SMP 30 and a method for detection of the DNA.

CONSTITUTION: This polypeptide has a specific amino acid sequence. The reagent for measuring human senescence marker protein SMP 30 contains a cloned DNA containing the DNA region coding this polypeptide, an antibody against this polypeptide or its part as an antigen or a fragment affinitive to the antigen. A probe for detecting a gene coding human senescence-related marker protein SMP 30, containing a single-stranded nucleic acid fragment containing a part of a base sequence represented by another sequence or its complementray base sequence.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-97399

(43) 公開日 平成7年(1995)4月11日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/47		8318-4H		
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 Q 1/68	A	9453-4B		
G 0 1 N 33/53	D			
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-265681

(22) 出願日 平成5年(1993)9月29日

(71) 出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都新宿区西新宿2丁目7番1号

(72) 発明者 藤田 敬子

東京都練馬区東大泉7-4-7

(72) 発明者 丸山 直記

東京都板橋区栄町18-5-501

(74) 代理人 弁理士 谷川 英次郎

(54) 【発明の名称】 新規ポリペプチド及びヒト老化マーカータンパク SMP30測定用試薬

(57) 【要約】

【目的】 ヒトの老化関連タンパク H-SMP30 の単離確立、更にその結合タンパクの確立、そしてこれを用いる免疫学的測定手段を提供すること並びに H-SMP30 をコードする DNA 及び該 DNA を検出するための手段を提供すること。

【構成】 配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA 領域を含む、クローン化 DNA、請求項 1 記載のポリペプチド又はその部分を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む、ヒト老化マーカータンパク SMP30 測定用試薬及び配列表の配列番号 1 に示される塩基配列の一部又はそれと相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を含む、ヒト老化マーカータンパク SMP30 コード遺伝子検出用プローブを提供した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードするDNA領域を含む、クローン化DNA。

【請求項3】 前記DNA領域は、配列表の配列番号1で示される94番目から990番目で示される塩基配列を有する請求項2記載のDNA。

【請求項4】 請求項1記載のポリペプチド又はその部分を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む、ヒト老化マーカータンパクSMP30測定用試薬。

【請求項5】 配列表の配列番号1に示される塩基配列の一部又はそれと相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を含む、ヒト老化マーカータンパクSMP30コード遺伝子検出用プローブ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒトの臓器、組織、血液、尿、髄液に存在するヒト老化マーカータンパク（以下、H-SMP30という）に関する。更に本発明はその抗体及び測定試薬に関する。本測定は肝細胞障害のモニタリングとして利用することや腎尿細管の破壊のモニターに使用される。更に新生児の肝臓および腎臓の発達を観察することができる。また、この測定により対年齢の老化率の観察を行い健康状態のモニターとして使用される。

【0002】

【従来の技術】ラット肝臓SMP30は老化因子としてアンドロゲン非依存的に加齢と共にその値が低下し、その週令と相関することが本発明者らの1人により明らかにされた（Biochimica Biophysica Acta 1116:297-305 (1992)）。ヒトのSMP30については確立されておらず、その測定も不可能であった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】H-SMP30は、肝障害や腎障害で血中濃度が増大する。従って、血中のH-SMP30を測定することにより、肝細胞障害のモニタリングとして利用することや腎尿細管の破壊のモニターに使用される。また、これを測定することにより、新生児の肝臓及び腎臓の発達を観察することができる。また、H-SMP30は老化するほどその濃度が下がるので、これを測定することにより対年齢の老化率の観察を行い、健康状態をモニターすることもできる。

【0004】本発明の目的はヒトの老化関連タンパクH-SMP30の単離確立、更にその結合タンパクの確立、そしてこれを用いる免疫学的測定手段を提供することである。さらにまた、本発明の目的は、H-SMP30をコードするDNA及び該DNAを検出するための手段を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者は、鋭意研究の結果、H-SMP30の単離に成功し、これをコードするDNAのクローン化に成功し、かつ該DNAの塩基配列の決定及びそれに基づくH-SMP30のアミノ酸配列の決定に成功した。さらにH-SMP30に対する抗体を多数作製した。そしてこれらの抗体を使用して組織中のH-SMP30の存在を確認するに至った。さらにこれらの抗体を組み合わせることにより免疫測定法を確立し、血液中のH-SMP30を測定することを初めて見いだした。

【0006】すなわち、本発明は、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。また、本発明は、上記本発明のポリペプチドをコードするDNA領域を含む、クローン化DNAを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のポリペプチド又はその部分を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む、ヒト老化マーカータンパクSMP30測定用試薬を提供する。さらに、本発明は、配列表の配列番号1に示される塩基配列の一部又はそれと相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を含む、ヒト老化マーカータンパクSMP30コード遺伝子検出用プローブを提供する。

【0007】以下、本発明を詳細に説明する。

【0008】本発明のポリペプチドであるH-SMP30はヒトの肝臓に多く存在しそのDNAのアミノ酸配列は配列表の配列番号2で示される通りである。

【0009】その単離する方法は概略以下の通りである。

【0010】ヒト肝臓をホモジェナイズし、遠心する。この上清を50-70%硫酸で塩析しタンパクを沈澱させる。遠心して沈澱したタンパクを回収しこれを再溶解させ分画等電点電気泳動する。pI=4.9の分画を回収し透析後、ゲル濾過して分子量30kDaの目的のH-SMP30を得る。なお、単離方法の詳細は下記実施例に記載されている。

【0011】更に大量に得る方法としてこのH-SMP30のcDNAのクローニングを行い、プラスミドベクターに組み込み培養により大量にH-SMP30を得た。

【0012】そのクローニングは次のように行うことができる。肝組織中よりRNAを抽出し、オリゴdTセルロースカラムによりPoly(A)⁺RNAとする。このPoly(A)⁺RNAよりDNAを合成し、PCR法により増幅する。これを制限酵素λZapIIで切断したcDNAライブラリーを得る。更にT4リガーゼで処理し、EcoRI-NotIアダプターにリグートする。過剰のアダプターをゲル濾過で除去し、λZapIIベクターにリグートする。

【0013】次にH-SMP30のcDNAフラグメン

トを得るため、既に単離したH-SMP30の一部のアミノ酸配列よりオリゴヌクレオチドプライマーを合成する。DNA増幅キットによりPCR法で増幅し、得られたDNAは電気泳動で精製し回収する。この回収DNAをプラスミドのSma I部位にインサートする。このようにして得られたプロダクトのDNA配列を確認し、スクリーニングのプロープとして使用する。さきに作製したλ ZapII のブランクをこのプロープでスクリーニングする。これで陽性と確認された、プラスミドをE coli XL1-BLUEで増幅する。これによりH-SMP30をコードするDNAを含むプラスミドを得る。これを数種類の制限酵素で切断し配列を分析する。このデータを基にコンピューター解析し全核酸配列およびアミノ酸配列を決定する。

【0014】上述のように、本発明は、上記本発明のポリペプチド又はその部分を抗原とする抗体又はその抗原結合性フラグメント（Fabフラグメント及びFab'）、フラグメント等）を含むH-SMP30測定用試薬を提供する。この抗体は、下記に詳細に説明するように、上記本発明のポリペプチドを免疫原として用いる常法により得ることができる。また、このポリペプチドの一部分を抗原として利用することもできる。この場合、このような部分ポリペプチドを合成するには固相合成法を採用することができる。例えば、まずp-ヒドロキシベンジル樹脂にLEUを結合させ、順次C末端より保護アミノ酸を反応させ合成していくものである。最終的には保護基及びC末端を樹脂から除去しイオン交換クロマトグラフィーにより精製することにより得ることができる（詳しくは「ペプチド合成の基礎と実験」（丸善（株）、1985年）参照）。また自動合成装置により製造することもできる（「続生化学実験講座2タンパク質下」（東京化学同人、1987年）参照）。本発明を実施するにあたっては、前記方法により製造されたペプチドは、免疫活性を高めるためや高分子タンパクに結合させるために必要に応じて修飾剤、例えば無水酢酸、チオグリコール酸で、アセチル化、アルキル化、チオール化など化学的修飾したものを使用することもできる。

【0015】免疫原としては高分子タンパク、例えば、ヘモシアニン、アルブミン、IgGなどに結合させたものを用いることができる。その結合法は一般的に水溶液中で行なわれるのが通例であり本発明においてもこの方法を利用することができる（これについては例えば「酵素免疫測定法」（タンパク質核酸酵素増補版、共立出版、1988）参照）。一般的には水溶性カルボジミドやベンゾキノ、グルタルアルデヒドなどを縮合剤としてpH5.0～10.0で蛋白濃度0.5～5.0mg/mlで縮合剤を0.01～5.0mg/mlを加え室温から37℃で反応させ1～4時間後にセファデックスG-50カラムで脱塩する。これにより免疫原を得ることができる。

【0016】抗体の製造方法としては、前記方法により精製された免疫原を例えば、ウサギ、山羊、馬、モルモット、ニワトリなどの温血動物に体重1kgあたり0.3～2mgを1～数回背中皮下、フットパット、大腿筋などにアジュバントとともに注射し、得られた血清は必要に応じて精製し、当該抗体を得ることができる。逆受身凝集反応や二抗体沈降RIA法、二抗体ELISA競争反応法などを本方法により実施するにあたっては、血清を精製せずにそのまま希釈して用いることもできる。

【0017】また、モノクローナル抗体を取得する方法は、既に多くの成書に開示されている（例えば、「モノクローナル抗体とがん」、（株）サイエンスフォーラム社、1985参照）。一般的には、H-SMP30又はその部分をアジュバントと共に注射し、抗体価が高くなった状態で脾臓を摘出し、その脾細胞をポリエチレングリコールによりマウスミエローマ細胞と融合させ、その細胞より当該抗体を産生するクローンをモノクローナル細胞として増殖させ、マウス腹腔中あるいは培養液中で大量細胞培養することにより、製造することができる。

【0018】このようにして得られた抗体又はその抗原結合性フラグメントを使用して組織中に存在するH-SMP30を確認することができる。すなわち、オートプシーされた組織をスライドに固定した後、この抗体を反応させ更に例えばパーオキシダーゼ等で標識した抗IgG抗体を反応させる。そして基質液を反応させることによりこのH-SMP30の存在部位を染色することができる。

【0019】また、前記した抗体又はその抗原結合性フラグメントは、そのまま、あるいは酵素標識、放射標識、蛍光標識等を結合してH-SMP30測定用試薬とすることができる。あるいは該抗体又はその抗原結合性フラグメントをウェルやビーズ等に固相化したものもH-SMP30測定用試薬として用いることができる。これらの使用態様、すなわち、これらを用いる免疫測定方法はこの分野において周知であり、いずれの免疫測定方法に用いられるものであってもよい。すなわち、このような免疫測定法として、放射免疫測定法、酵素免疫測定法、免疫比濁法、凝集免疫法等を挙げることができ、これらのいずれの方法を採用してもH-SMP30の定量を充分行なうことができる。本発明で測定されるH-SMP30は分子量30kdであり、標識を用いる免疫測定法ではサンドイッチ法により定量することが好ましい。この方法は、マイクロタイタープレートやポリスチレンビーズに本発明で得られた抗体を0.001～0.1mg/mlの濃度で4℃一夜放置し固定化し、生理食塩水溶液で洗浄し、2%BSA溶液でポストコートし、固定化抗体を得るものである。

【0020】本発明の試薬を用いる酵素免疫測定法では、該固定化抗体とは異なる抗原決定基を認識する抗体と酵素を化学的に結合させた酵素標識抗体とH-SMP

5

30を含む検体とを反応させ、同時にあるいは10分～3時間後に該固定化固相を反応させることができる。実施の際の反応温度は4℃～40℃であり、好ましくは25～38℃である。洗浄後、固相に結合した酵素の量を酵素基質を加え活性測定することにより検体のH-SMP30を定量することができる。本方法において用いることのできる酵素は、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどである。この際基質は、用いる酵素に適したものをを用いることは言うまでもない。例えば、ABTS、ル

ミノール-H₂O₂ (パーオキシダーゼ用)、3-(2'-ピロトリシクロ[3,3,1,^{1'},^{1''}]デカン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスフォルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタン二ナトリウム塩 (AMPPD)、p-ニトロフェニルホスフェート、メチルウンベリフェリルホスフェート (アルカリホスファターゼ用)、p-ニトロフェニル-β-D-ガラクトース、メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトース、3-(2'-スピアダマンタン)-4-(3-β-D-ガラクトピラノシル)フェニル-1,2-ジオキセタン (AMGPD) (β-ガラクトシダーゼ用)などを挙げるこ

10

20

30

40

50

6

塩水あるいは蒸留水で洗浄を行い、その放射能活性を計測するものである。測定にはシンチレーションカウンタを使用するものである。

【0022】また、本発明のH-SMP30測定用試薬は、イソルミノールやアクリジネスエステルなどをラベルした化学発光測定法、フルオレッセインやローダミンをラベルした蛍光免疫測定法に用いられるものであってもよい。この際、ラベル体の標識は活性化エステル法やイソチアネート法を採用することにより容易に行なうことができる(「酵素免疫測定法」(医学書院、1987年)参照)。

【0023】また、本発明のH-SMP30測定用試薬は、凝集免疫法に用いられるものであってもよい。すなわち、抗H-SMP30抗体を血球や人工粒子(例えばラテックス、ゼラチン粒子)に結合させ、検体の抗原と反応させ、生じた凝集像によりその濃度を判定するものである。血球や粒子への抗体の結合はタンニン酸処理法やグルタルアルデヒド法により行なうことができる(「免疫学実験入門」(学会出版センター、1981年)参照)。その反応は室温で1～5時間放置することにより行い生じた血球や粒子の凝集像をパターンアナライザや目視で判定することができる。

【0024】更に、免疫比濁法用の試薬であってもよく、この場合には、前述の凝集免疫法で示した凝集を光学的散乱により測定するものである。例えば、波長を550nmにセットした分光光度計に抗体感作粒子と高分子化ペプチド抗原とサンプルを混和し直ちにその吸光度変化を測定することにより行なうことができる。

【0025】上記免疫測定に供される検体としては、ヒトの臓器、組織、血液、尿及び髄液等を挙げるこ

【0026】本発明はさらに、配列表の配列番号1に示される塩基配列の一部又はそれと相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸断片を含む、H-SMP30コード遺伝子検出用プローブを提供する。プローブに含まれるヌクレオチド数は特に限定されないが通常10～30程度、特に15～25程度が好ましいがこれより長いものであってもよい。プローブは放射標識、蛍光標識等で標識されたものであり、その使用方はこの分野において周知である。

【0027】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0028】実施例1

ヒト肝臓100gを1000mlの10mM Tris-HCl/1mMDTT, 1mMフェニルメチルスルフォニルフルオリド、2mM ATP、2mM NaF溶液(pH=8.0)でホモジェナイズし、60分間遠心(35000xg)した。この上清を50～70%硫酸で塩析し

タンパクを沈澱させた。20分間遠心(35000xg)して沈澱したタンパクを回収し、これを前述の抽出液100mlで再溶解させ同液で3回透析した。この液をシェークコース濃度勾配等電点電気泳動し、 $pI=4.9$ (4.5-5.5)の分画を回収し透析した。さらに濃縮し、セファデックスG-75(Tris-HCl, 1mM DTT, 100mM NaCl, $pH=8.0$)でゲル濾過して分子量30kDaの目的のH-SMP30を1.0mg得た。なお、このようにして精製された物質が、H-SMP30であることは抗ラットSMP-30ウサギ抗体の交叉性を利用したウェスタンブロット法で分子量30kdのバンドにより確認した。

【0029】実施例2 H-SMP30のcDNAのクローニング

H-SMP30のcDNAのクローニングを行い、プラスミドベクターに組み込み培養により大量にH-SMP30を得た。これは次のように行った。

【0030】肝組織中よりRNAを抽出し、オリゴdTセルロースカラム(ファルマシア社)によりPoly(A)⁺RNAとした。このPoly(A)⁺RNAよりDNAを合成し、PCR法により増幅した。PCR法に用いたプライマーの配列は、5'-GGGAGGCCCTTTT TTT-3'及び5'-AAGGAATCCCCCCCCCCCC-3'であった。これを制限酵素 λ ZapIIで切断したcDNAライブラリーを得る。更にT4リガーゼで処理し、EcoRI-NotIAダプター(Invitrogene社)にリゲートした。過剰のアダプターをゲル濾過で除去し、 λ ZapIIベクター(Stratagene社)にリゲートした。

【0031】次にH-SMP30のcDNAフラグメントを得るため、既に単離したH-SMP30の一部のアミノ酸配列よりオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。合成したプライマーの配列は、5'-AGGCTATGTGCCACATTGGA-3'及び5'-TTCCTCAGCCATGGTACCAGCAA-3'であった。これらのプライマーを用い、先に作製したcDNAライブラリーを用い鋳型にして、DNA増幅キットによりPCR法で増幅し、得られたDNAは電気泳動で精製し回収した。この回収DNAをプラスミドのSmaI部位にインサートした。

【0032】このようにして得られたプロダクトのDNA配列を確認し、スクリーニングのプロープとして使用するため³²Pで標識した。さきに作製した λ ZapIIのバクテリオファージのブラーク(1×10^5)をこのプロープでスクリーニングする。このブラークをHybond-Nで固定しハイブリダイゼーション後この³²Pで標識したプロープでハイブリダイゼーションした。オートラジオグラフィーはX線フィルムに感光させて行った。これで陽性と確認された、プラスミドをE.coli XL1-BLUEで増幅した。これによりH-SMP30をコードするDNAを含むプラスミドを得た。これを数種類の制限酵素で切断し配列を分析した。このデータを基にコンピュー

ー解析し全核酸配列およびアミノ酸配列を決定した。結果を配列表の配列番号1に示す。なお、配列番号1中に示されるアミノ酸配列のみを取り出して示したものが配列番号2である。

【0033】実施例3

抗ヒトSMP30特異ウサギ抗体の調製

実施例1で調製したH-SMP301mgを含む1mlのPBSを1mlのフロイント完全アジュバントと混合し、ウサギ背皮下に各々注射した。次に3週間後、上記結合物を同様に注射した。更に4週間後に再度同量の免疫原を注射し、その1カ月後に同量の免疫原を背皮に注射した。最後の注射の1週間後に全採血し、抗血清を得た。この抗血清を50-70%硫酸で塩析しタンパクを沈澱させた。20分間遠心(10000xg)して沈澱したタンパクを回収し、これを前述のPBS, $pH7.0$ で再溶解させ同液で3回透析した。この液を、スーパーコース12で(PBS, $pH=7.0$)でゲル濾過して分子量160kDaのIgGフラクションを得た。

【0034】実施例4

抗体とパーオキシダーゼとの結合物の調製

ホースラディッシュパーオキシダーゼ(以下PODと記す、ペーリンガー社)5mgを50mM炭酸水素ナトリウム水溶液($pH8.0$)1mlに溶かし、GMBS5mgを含むジメチルホルムアミド溶液100 μ lを混和した。室温2時間攪拌後、予め実施例3で作製した抗ヒトSMP30特異ウサギ抗体のF(ab')₂を0.1Mの2メルカプトエチルアミンで還元し脱塩したFab2mgを添加し3時間室温に放置した。この反応液を予めPBSで平衡化したセファクリルACA34カラムにチャージし、溶出しPODと抗体の結合物1mgを得た。

【0035】実施例5

ELISA法によるH-SMP30の測定

実施例3で得られた抗ヒトSMP30IgG抗体のPBS溶液(10 μ g/ml)を96穴のマイクロプレート(ヌンク社製)に50 μ l/ウエルずつ分注し、4℃で一晩放置した。このマイクロプレートを生理食塩水で2回洗浄した後、5%BSAを含むPBS溶液200 μ lを各ウエルに分注し、4℃にて一晩放置した。以後の洗浄は全て0.05%Tween 20を含むPBSで行なった。このプレートを3回洗浄し、検体あるいはスタンダード抗原、50 μ lを加え室温で1時間攪はんした。3回洗浄し、実施例4で作製した抗ヒトSMP30ウサギ抗体とPODとの結合物25 μ l(5000倍希釈)を加え室温1時間反応させた。3回の洗浄の後、0.1%のABTSと1mMのH₂O₂を含む基質液100 μ lを各ウエルに分注し、室温で30分反応させた後、タイターテックマルチレコーダーを用いて415nmにおける吸光度を測定した。図1にその定量曲線を示す。

【0036】実施例6

血球凝集反応によるH-SMP30の測定

ニワトリ赤血球をPBSで3回洗浄した。この4ml溶液にタンニン酸溶液(0.025mg/ml PBS)20mlを加え37℃、60分加温した。PBSで3回洗浄し、この4ml溶液に抗H-SMP30ヤギ抗体(2mg/ml PBS)10mlを加え37℃、3時間加温した。PBSで3回洗浄し1%ヤギ血清を含むPBSに懸濁し1%血球溶液とした。検体もしくはスタンダード*

* 溶液を96穴のタイタープレートに2"倍希釈で実施例2で得られた高分子結合物とともに加え(25μl)、抗体感作血球(1%)25μlを各ウェルに添加した。攪はん後、3時間室温に放置し、その凝集像を判定した。結果を下記表1に示す。

【0037】

【表1】

表1

	希釈倍率					
	x 2	x 4	x 8	x 16	x 32	x 64
スタンダード溶液	+	+	+	+	±	-
メディウム対照	-	-	-	-	-	-

【0038】

【発明の効果】本発明により、H-SMP30が初めて単離され、そのアミノ酸配列が決定された。さらに、本発明により、H-SMP30をコードするDNAが初めてクローニングされ、その塩基配列が決定された。さらに、本発明により、H-SMP30に対する抗体が初めて提供された。これにより、ヒト組織中又は体液中に存在するH-SMP30を検出及び定量することができるようになった。従って、本発明は、肝障害や腎障害のモ※

※ニタリング及び新生児の肝臓及び腎臓の発達の程度の観察に大いに寄与するものと考えられる。

20 【0039】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1356

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

ACAAACACCA AGGAGTGGAG GTCAGAGTGT CACTTTTTTG TTTTCTTTT GAAAGATCAT   60
TCGAGAAACA CGTCACTGAT CTCCTCGG ACC ATG TCT TCC ATT AAG ATT GAG   114
Met Ser Ser Ile Lys Ile Glu
1 5
TGT GTT TTG CCA GAG AAC TGC CGG TGT GGT GAG TCT CCA GTA TCG GAG   162
Cys Val Leu Pro Glu Asn Cys Arg Cys Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu
10 15 20
GAA GTG TCC AAC TCT CTG CTC TTT GTA GAC ATT CCT GCA AAA AAG GTT   210
Glu Val Ser Asn Ser Leu Leu Phe Val Asp Ile Pro Ala Lys Lys Val
25 30 35
TGC CGG TGG GAT TCA TTC ACC AAG CAA GTA CAG CGA GTG ACC ATG GAT   258
Cys Arg Trp Asp Ser Phe Thr Lys Gln Val Gln Arg Val Thr Met Asp
40 45 50 55
GCC CCA GTC AGC TCC GTG GCT CTT CGC CAG TCG GGA GGC TAT GTT GCC   306
Ala Pro Val Ser Ser Val Ala Leu Arg Gln Ser Gly Gly Tyr Val Ala
60 65 70
ACC ATT GGA ACA AAG TTC TGT GCT TTG AAC TGG AAA GAA CAA TCA CCA   354
Thr Ile Gly Thr Lys Phe Cys Ala Leu Asn Trp Lys Glu Gln Ser Ala
75 80 85
GTT GTC TTG GCC ACG GTG GAT AAC GAC AAG AAA AAC AAT CGC TTC AAT   402
Val Val Leu Ala Thr Val Asp Asn Asp Lys Lys Asn Asn Arg Phe Asn
90 95 100
GAT GGG AAG GTG GAT CCC GCC GGG AGG TAC TTT GCT GGC ACC ATG GCT   450

```

11 12
 Asp Gly Lys Val Asp Pro Ala Gly Arg Tyr Phe Ala Gly Thr Met Ala
 105 110 115
 GAG GAA ACA GCT CCA CCA GTT CTT GAG CGG CAC CAG GGG GCC CTG TAC 498
 Glu Glu Thr Ala Pro Ala Val Leu Glu Arg His Gln Gly Ala Leu Tyr
 120 125 130 135
 TCC CTC TTT CCT GAT CAC CAC GTG AAA AAG TAC TTT GAC CAG GTG CAC 546
 Ser Leu Phe Pro Asp His His Val Lys Lys Tyr Phe Asp Gln Val Asp
 140 145 150
 ATT TCC AAT GGT TTG GAT TGG TCG CTA GAC CAC AAA ATC TTC TAT TAC 594
 Ile Ser Asn Gly Leu Asp Trp Ser Leu Asp His Lys Ile Phe Tyr Tyr
 155 160 165
 ATT GAC AGC CTG TCC TAC TCC GTG GAT GCC TTT GAC TAT GAC CTG CAG 642
 Ile Asp Ser Leu Ser Tyr Ser Val Asp Ala Phe Asp Tyr Asp Leu Gln
 170 175 180
 ACA GGA CAG ATC TCC AAC CCG AGA AGT GTT TAC AAG CTA GAA AAG GAA 690
 Thr Gly Gln Ile Ser Asn Arg Arg Ser Val Tyr Lys Leu Glu Lys Glu
 185 190 195
 GAA CAA ATC CCA GAT CGA ATG TGT ATT GAT GCT GAG GGG AAG CTC TGG 738
 Glu Gln Ile Pro Asp Gly Met Cys Ile Asp Ala Glu Gly Lys Leu Trp
 200 205 210 215
 GTG GCC TGT TAC AAT CGA GGA AGA GTG ATT CGT TTA GAT CCT GTG ACA 786
 Val Ala Cys Tyr Asn Gly Gly Arg Val Ile Arg Leu Asp Pro Val Thr
 220 225 230
 GCG AAA AGA CTT CAA ACT GTG AAG TTG CCT GTT GAT AAA ACA ACT TCA 834
 Gly Lys Arg Leu Gln Thr Val Lys Leu Pro Val Asp Lys Thr Thr Ser
 235 240 245
 TGC TGC TTT GGA GGG AAG AAT TAC TCT GAA ATG TAT GTG ACC TGC GCC 882
 Cys Cys Phe Gly Gly Lys Asn Tyr Ser Glu Met Tyr Val Thr Cys Ala
 250 255 260
 CCG GAT GGG ATG GAC CCC GAG GGT CTT TTG AGG CAA CCT GAA GCT GGT 930
 Arg Asp Gly Met Asp Pro Glu Gly Leu Leu Arg Gln Pro Glu Ala Gly
 265 270 275
 GGA ATT TTC AAG ATA ACT GGT CTG GGG GTC AAA GGA ATT GCT CCC TAC 978
 Gly Ile Phe Lys Ile Thr Gly Leu Gly Val Lys Gly Ile Ala Pro Tyr
 280 285 290 295
 TCC TAT GCG GGA TGAGGACAGG TCTTCTTTCC TGCCAGAGGG AGCTCTGAAG 1030
 Ser Tyr Ala Gly

ACAACTAGAG AATTCTGGGC CTGAAATTTC AATCTAGTTA GAAAGAAAA TGAGGCAATG 1090
 ATTTTATTAA CAGCGTTAAG TTTTAATTTA CAACTTTTAA AAGGCAGAGC ATTTTTAACA 1150
 AGGGGTGACA GGTGGTTTTG ATAACACACT TATAAGGCTT TCTGTAAAAG GACTATAGA 1210
 AGGGCGAAGA ATCGTTCAAC TGCAATCAG CCTCTTGATT CTTTGTAAAT TGCCAGGGTG 1270
 GGTGGGTACA TATCTCTTCT TGATTCTGCA TTTCATACCT AACTATATTA AAGCTTCAAG 1330
 GAACAATAAA TAGTAACCTG GTAATG 1356

【0040】配列番号 : 2

* 配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 299

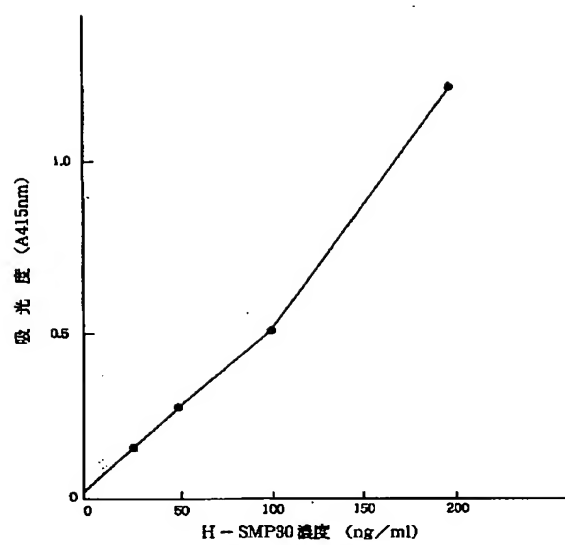
* トポロジー : 直鎖状

配列

Met Ser Ser Ile Lys Ile Glu Cys Val Leu Pro Glu Asn Cys Arg Cys
 1 5 10 15
 Gly Glu Ser Pro Val Trp Glu Glu Val Ser Asn Ser Leu Leu Phe Val

【図1】抗H-SMP30抗体を用いたELISA法に

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
// C 0 7 K 99:00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所